

# 家兔自发性蛛网膜下腔出血早期脑损伤模型的初步研究

范高阳 王业忠 许 晖 刘 祺 姬云翔 赵 冬<sup>△</sup>

(石河子大学医学院第一附属医院神经外科 新疆 石河子 832008)

**摘要** 目的:建立一种可重复的、有典型神经损伤症状的自发性蛛网膜下腔出血(SAH)动物模型,为研究蛛网膜下腔出血后早期脑损伤(EBI)的机制提供可靠的动物模型。方法:选用新西兰大耳白兔 60 只,随机分为实验组、对照组、空白组。采用枕大池穿刺一次注入自体动脉血法建立 SAH 模型。在 4h、8h、12h、24h、48h、72 h 时间点,观察比较行为学与脑组织形态学的变化。结果:(1)实验组枕大池和蛛网膜下腔内发现大量的血凝块和血液。(2)实验组光镜下可观察到蛛网膜下腔大量红细胞,神经元细胞水肿,电镜下可见胶质细胞空泡样改变,神经元细胞线粒体肿胀,髓鞘内存在空泡和板层分离现象。(3)实验组造模后均出现明显的神经系统损伤,对照组 4h 出现典型神经系统损伤表现,12h 后恢复正常,空白组未见神经系统损伤表现。结论:枕大池一次注血法是一种简便、可重复的症状性自发性蛛网膜下腔出血早期脑损伤模型,适宜于研究早期脑损伤的致病机制。

**关键词** 动物模型;自发性蛛网膜下腔出血;早期脑损伤;行为学

中图分类号:Q95-3 R743.35 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)20-3860-04

## Establishment of Early Brain Injury Model of Spontaneous Subarachnoid Hemorrhage in Rabbits

FAN Gao-yang, WANG Ye-zhong, XU Hui, LIU Qi, JI Yun-xiang, ZHAO Dong<sup>△</sup>

(Department of Neurosurgery, first affiliated hospital, The University of Xinjiang Shihezi, Shihezi, 832008, China)

**ABSTRACT Objective:** To build a repeatable and typical nerve injury symptoms animal model of symptoms symptomatic subarachnoid hemorrhage (SAH) in rabbit. To provide a dependable animal model to research the mechanism of early brain injury(EBI).

**Methods:** A total of 60 rabbits were divided randomly into 3 groups, including experimental group, control group, blank group. Set up the SAH model using cisternal puncture injection autologous arterial blood one time. To observe and compare the histomorphology and behavior of brain tissue in 4h, 8h, 12h, 24h, 48h, 72 h. **Results:** (1) A lot of blood clots and blood has been found in subarachnoid and cisterna magna of the experimental group. (2) In the subarachnoid space of the experimental group could be observed under the light microscope a lot of red blood cells and nerve cells edema; Under the electron microscope, such changes could be observed as vacuolar changes of glial cells, swelling of neurons mitochondria, vacuole and lamellar separation in myelin sheath. (3) There was apparent significant neurological damage after modeling in the experimental group. Typical nervous system damage was found in the control group at 4h, but returned to normal at 12h. No neurological damage was found in blank group. **Conclusion:** The method of cisternal puncture injection blood one time is a simple and repeatable model of symptoms spontaneous subarachnoid hemorrhage (SAH), suitable for research on EBI

**Key words:** Animal model; Spontaneous subarachnoid hemorrhage; Early brain injury; Morphology

**Chinese Library Classification(CLC):** Q95-3 R743.35 **Document code :** A

**Article ID:** 1673-6273(2011)20-3860-04

### 前言

自发性蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)是严重威胁人类生命的疾病,其死亡率高达 50%<sup>[1]</sup>。近年来研究表明,SAH 后早期脑损伤(early brain injury, EBI)是 SAH 患者死亡的首要原因<sup>[2]</sup>。EBI 是 SAH 后 72 h 以内整个脑组织发生的直接损伤,其具体损伤机制不明<sup>[3]</sup>。基于 SAH 后 EBI 导致的严重后果,建立一种适宜的 SAH 后 EBI 模型,用来研究其致病机制具有重要意义。本实验研究了经枕大池注入自体动脉血建立自发性 SAH 模型,在 Endo 模型<sup>[4]</sup>的基础上进行一些改进,建立一

种结果可靠、操作简便和经济实用的症状性 SAH 模型,为深入研究 SAH 所致 EBI 的机制提供实验室理论依据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 选用雄性新西兰大耳白兔 60 只,体重 2.0~3.0 kg,兔龄 3~5 个月(由石河子大学实验动物中心提供)。实验动物随机分为:实验组(36 只,注入自体非抗凝动脉血 0.8ml/kg)、对照组(18 只,注入平衡液 0.8ml/kg)、空白组(6 只,仅做枕大池穿刺)。根据不同的取材时间分为 4h、8h、12h、24h、48h、72 h 共计 6 个亚组,其中实验组每亚组各 6 只兔子,对照组每亚组各 3 只,空白组 6 只。

1.1.2 实验器材和试剂 QS11010 型兔鼠两用解剖台、QS11121 型哺乳类手术器械(张家港市青松生物医学仪器有限公司)、电镜(Olympus BK60,日本)、显微照相系统(Olympus,日本)、电

作者简介:范高阳(1984-)男,硕士研究生,主要研究方向:脑血管病,电话:13779596896, E-mail: shzlamb@sina.com

△通讯作者:赵冬,副主任医师, Tel: 15001643966,

E-mail: shzzhaodong112@163.com

(收稿日期:2011-02-20 接受日期:2011-03-21)

镜(JEM-1230 ,JEOL)、4%多聚甲醛及 2%戊二醛(由石河子大学医学院病理实验室提供)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型制备 采用枕大池一次注入自体动脉血法制成兔自发性蛛网膜下腔出血早期脑损伤模型,所有试验均于上午 10:00 进行。①于兔耳缘静脉建立液体通道,氯胺酮(0.1/2ml)稀释至 5ml 静脉注射麻醉,初次麻醉剂量为 1ml/kg。麻醉成功表现:角膜反射消失,疼痛刺激无反应,四肢软瘫,呼吸平稳。②麻醉后取俯卧位,将兔固定于解剖台上,保持呼吸道通畅。后枕部剃毛,枕大孔区 5cm 范围内消毒,于枕部中线作一直切口,长约 2.5 cm,切开皮肤和筋膜后,逐层钝性分离直达寰枕筋膜,充分显露寰枕筋膜,用 18G 静脉留置管与躯体成角 30° 穿刺枕大池,方向指向右眼外眦,穿破环枕筋膜时有明显突破感,停止进针,退出针芯,此时可见清亮脑脊液流出。同时取兔耳中央动脉的非抗凝血 0.8ml/kg,以 0.5 ml/s 的速度缓慢注入枕大池内,观察动物注血后的表现。生物蛋白胶固定留置管前端退出套管针,局部压迫后,将青霉素粉末撒在伤口局部,逐层缝合切口。③对照组的穿刺方法同实验组,置管后注入等量的平衡液,空白组仅行枕大池穿刺置管并见到清亮 CSF 流出,不注入任何液体。

1.2.2 取材方法 分别于建模后 4h、8h、12h、24h、48h、72 h 取材。具体操作步骤为:开胸暴露心脏,剪开右心耳,迅速将 15 号针头插入左心室,用生理盐水快速冲洗灌注,直至从右心耳流出澄清液。于视交叉后 1.0~1.5cm 冠状位取右侧颞叶脑组织,厚约 5mm,分为两部分,一部分固定于 4%多聚甲醛中用于 HE 和 MASSON 染色,一部分固定于 2%的戊二醛中用于行电镜观察。灌注、取材过程在要求在 5 分钟内完成。

1.2.3 病理切片观察 多聚甲醛中的组织行脱水、浸蜡、包埋、切片进行 HE 和 MASSON 染色,切片于显微镜下观察,于× 100 和× 400 显微镜下观察。戊二醛中的组织进行固定、脱水、包埋、切片后电镜观察。

1.2.4 家兔神经功能学观察 按照 Endo<sup>[5]</sup>神经功能评分标准,分别于 4h、8h、12h、24h、48h、72 h 各时间点对家兔实验前后神经功能损害进行评分。所有实验动物给予标准颗粒饲料和自来水喂养,昼夜室温控制在 20~23℃。根据动物在平坦地面上的运动及神经状态分为四级:1 级:活动正常;2 级:轻度或可疑的神经功能障碍(如精神差、嗜睡、萎靡、颈项强直、运动减少、反应迟钝、毛发杂乱);3 级:中度神经功能障碍(如咀嚼不能、肢体单瘫、无力);4 级:重度神经功能障碍(划圈运动、行走困难、四肢瘫等)。

1.3 统计学分析

运用 SPSS 13.0 统计软件处理。评分数据进行对数转换后,经检验符合正态分布,进行单因素方差分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,  $P < 0.05$  说明统计数据有差异,  $P < 0.01$  说明统计数据有显著差异。

2 结果

2.1 神经功能学评分:

造模后 4h 实验组和对照组均出现明显的神经功能障碍,之间无差异性;实验组造模后 8h、12h、24h、48h、72h 出现程度不等的异常精神症状,与对照组存在显著差异( $P < 0.01$ );实验组与空白组存在显著差异( $P < 0.01$ );对照组造模后 4h、8h 与空白组存在显著差异( $P < 0.01$ )(表 1)。

表 1 神经功能学比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of neurological function( $\bar{x} \pm s$ )

分组 Groups	4h	8h	12h	24h	48h	72 h
实验组 Experimental group	1.61± 0.00 <sup>a</sup>	1.39± 0.00 <sup>b</sup>	1.34± 0.12 <sup>c</sup>	1.19± 0.15 <sup>c</sup>	1.15± 0.12 <sup>c</sup>	1.10± 0.00 <sup>c</sup>
对照组 Control group	1.61± 0.00 <sup>a</sup>	1.19± 0.17 <sup>a</sup>	0.69± 0.00	0.69± 0.00	0.69± 0.00	0.69± 0.00
空白组 Blank group	0.69± 0.00	0.69± 0.00	0.69± 0.00	0.69± 0.00	0.69± 0.00	0.69± 0.00

注 a 表示与空白组相比有显著差异( $P < 0.01$ ) b 表示实验组与对照组相比有显著差异( $P < 0.01$ ) c 表示实验组与对照组、实验组与空白组有显著差异( $P < 0.01$ )。

Note:a presented there was significant difference when compared with blank group ( $P < 0.01$ ), b presented there was significant difference when compared with control group( $P < 0.01$ ), c presented there was significant difference when compared with blank group and control group( $P < 0.01$ ).

实验组造模后,神经功能学评分出现一定的时相性变化(图 1),造模后 4h 出现明显的神经行为学损伤症状,8h 后明显好抓牢,12h 持续出现神经系统损伤症状,造模后 4h 实验组和对照组无变化,较对照组存在神经系统损伤症状。

2.2 肉眼观察:

对照组和空白组颅脑解剖无异常发现。实验组均见有大量血凝块或血液分布于蛛网膜下腔(图 2),未见脑实质损伤。

2.3 大脑皮质神经元细胞形态学的改变:

实验组光镜下可观察到蛛网膜下腔大量红细胞(图 3),于实验后 12h 最重;神经细胞缺血性改变,表现为神经元细胞水肿,核浓缩深染,可见碎裂溶解现象(图 4),神经元细胞水肿带逐渐加重。电镜下可见胶质细胞空泡样改变,神经元细胞粗面内质网扩张,线粒体肿胀,溶酶体增多,髓鞘内存在空泡和板层

分离现象(图 5)。对照组和空白组均未见上述改变。

3 讨论

自发性 SAH 多为颅内动脉瘤破裂引起<sup>[6]</sup>,EBI 在 SAH 后的神经损伤中发挥重要作用,深入研究 SAH 后早期脑损伤的发生发展机制,对于降低 SAH 致残率和死亡率具有重要意义<sup>[7]</sup>。明确其发病机制,探索有效的治疗方法是改善 SAH 整体预后和生活质量的关键,已逐渐成为国内外研究的新热点,而适宜的早期脑损伤动物模型的建立是研究发病机制的基础。

许多学者认为 EBI 是 SAH 后 72 h 以内整个脑组织发生的直接损伤,涉及到迟发性脑血管痉挛出现(3d~2 周)之前脑组

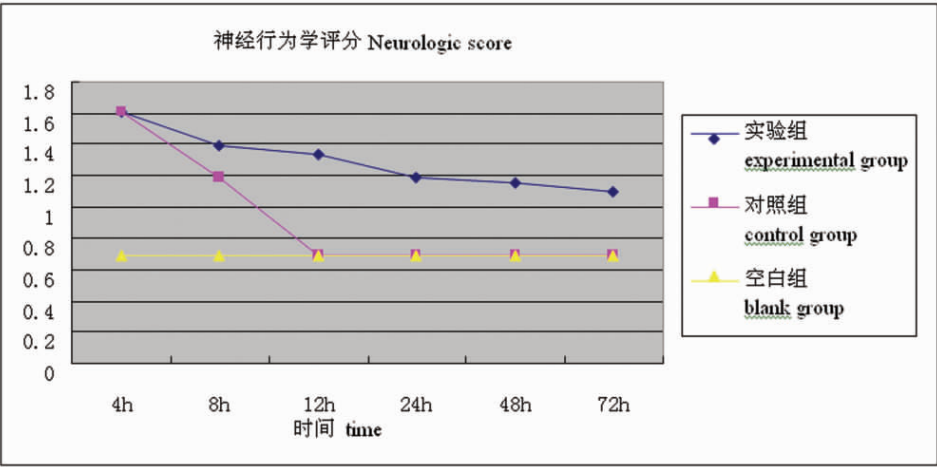


图 1 神经行为学评分的时相性变化特点

Fig. 1 Characteristics of phase change in the score of neurological behavior

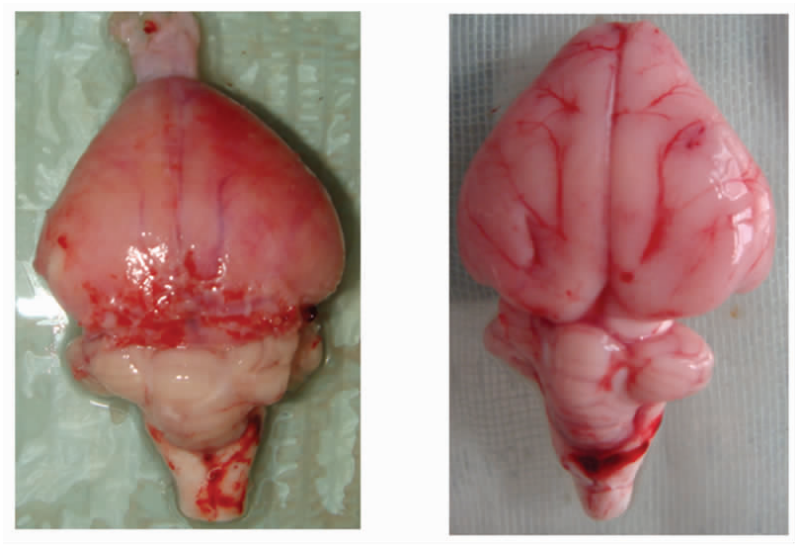


图 2 实验组可见有大量血凝块或血液分布于蛛网膜下腔

Fig. 2 Experimental group shows a large blood clot or blood distribution in the subarachnoid

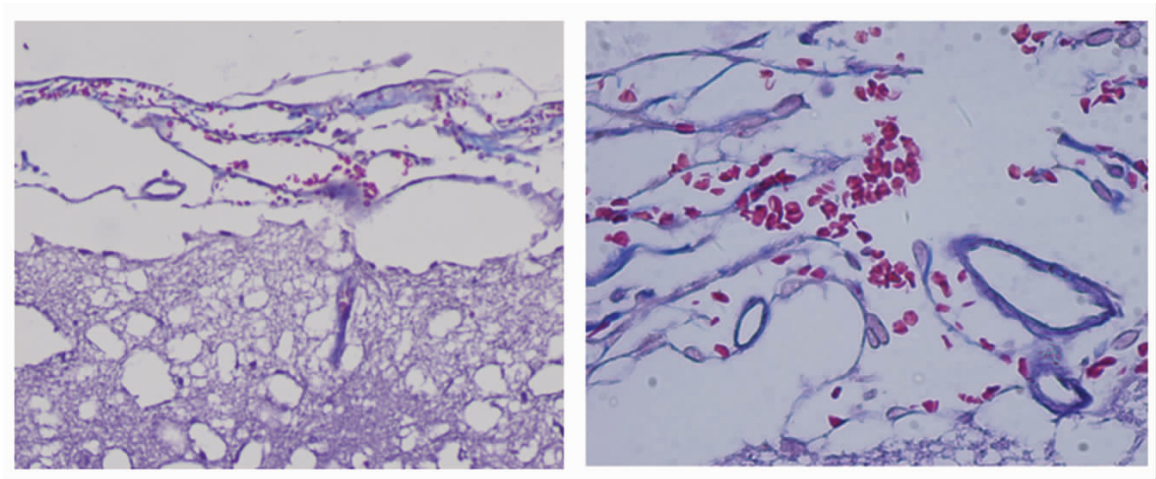


图 3MASSON 染色(x400) 蛛网膜下腔可见大量红细胞

Fig.3 MASSON Staining(x400): a large number of red blood cells in subarachnoid

织内所发生的病理生理事件,包括脑组织细胞死亡,血脑屏障破坏,脑水肿,急性脑血管痉挛,微血管功能障碍等<sup>[8]</sup>。关于SAH后早期脑损伤的病理生理改变机制尚未研究清楚,这主要与动物模型难以复制、多为无症状性SAH模型有关,因此,急需建立一种能模拟SAH后神经功能缺陷的动物模型。

Offerhaus<sup>[9]</sup> 最先报道通过注入自体血于蛛网膜下腔制备



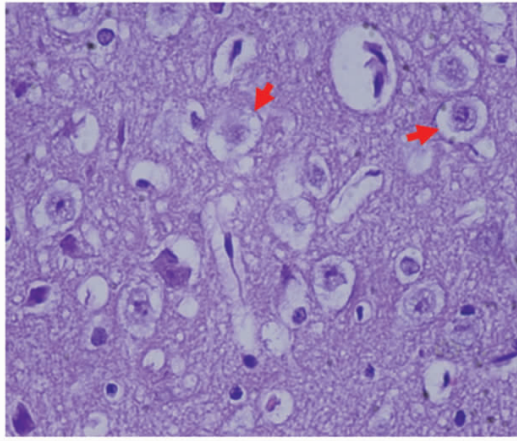


图4 HE染色(x400) 神经元细胞水肿,核浓缩深染,可见碎裂溶解现象

Fig.4 HE Staining(x400): Neuronal cell edema, deeply stained nuclear enrichment, fragmentation dissolution

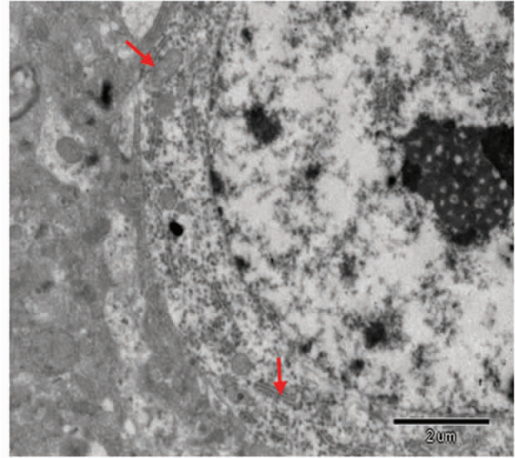


图5 电镜 线粒体肿胀,内质网扩张。

Fig. 5 electron microscope: Swelling of mitochondria and endoplasmic reticulum.

SAH模型。此后,Chan等<sup>[10]</sup>将自体动脉血经枕大池注入蛛网膜下腔,也成功建立了SAH模型。Endo等于1988年首次采用结扎兔双侧颈总动脉后枕大池二次注血的方法制备兔症状性SAH模型。Otsuji<sup>[11]</sup>等在Endo模型实验的基础上,进行改良,结果发现神经功能障碍更为严重,但死亡率高。以上方法均是为研究SAH后脑血管痉挛而设计,其中Bederson等<sup>[12]</sup>和Veelken等<sup>[13]</sup>报道了采用血管内丝线穿刺颈内动脉颅内分叉处的方法,成功地建立了一种新的SAH模型,并能模拟人SAH的病理生理急性期变化过程,适用于研究EBI。但该动物模型因出血不容易控制,病死率高,重复性差,报道较少。

本实验在SAH后迟发型脑血管痉挛模型的基础上进行改良,基于对SAH后EBI动物模型的定义,较好地建立了症状性SAH早期脑损伤模型。本动物模型建造成功后,结果显示:实验组造模后4h即出现明显的神经行为异常及功能缺损,表现为精神萎靡、嗜睡、活动减少、定向力差、食量和进水量减少,持续至12h后神经行为学症状逐渐好转;对照组造模后4h也出现典型的神经系统损伤症状,12h后恢复正常,空白组实验前后无变化。HE和MASSON染色发现,实验组蛛网膜下腔充满大量红细胞,神经细胞缺血性改变,证实已经造成神经元细胞的损伤,对照组和空白组均未见异常;电镜下可见胶质细胞空泡样改变,神经元细胞粗面内质网及线粒体损伤表现,进一步验证了SAH后的早期脑损伤。

实验组造模后出现典型神经系统症状,较空白组有显著差异( $P<0.01$ ),进一步的光镜和电镜观察神经元存在明显的损伤表现,说明本实验模型建造成功,同时对照组造模后4h即出现明显的神经行为学损伤,12h恢复正常,分析对照组出现此类症状的原因:急性颅高压,12h后症状缓解,进一步验证此项推断;空白组无神经行为学和细胞损伤,说明枕大池穿刺未造成损伤。综上所述,本实验建立的症状性蛛网膜下腔出血早期脑损伤模型,具有简便、重复性好的特点,神经损伤明显,可用于研究蛛网膜下腔出血后急性期损伤的病理生理机制。考虑本实验只是对该动物模型进行单方面的神经行为学研究,是否与临床上蛛网膜下腔出血后的病理生理变化过程一致,有待于进一步的研究与论证。

#### 参考文献 (References)

- [1] Ayer RE, Zhang JH. Oxidative stress in subarachnoid hemorrhage: significance in acute brain injury and vasospasm [J]. Acta Neurochir Suppl. 2008, 104:33-41
- [2] King MD, Laird MD, Ramesh SS, et al. Elucidating novel mechanisms of brain injury following subarachnoid hemorrhage: an emerging role for neuroproteomics [J]. Neurosurg Focus, 2010, 28(1): E10
- [3] Cahill J, Zhang JH. Subarachnoid hemorrhage: is it time for a new Direction[J]? Stroke. 2009, 40(3): S86-S87
- [4] Endo S, Branson PJ, Alksne JF. Experimental model of symptomatic vasospasm in rabbits[J]. Stroke, 1988, 19(11): 1420-1425
- [5] Broderick JP, Brott TG, Duldner JE, et al. Initial and recurrent bleeding are the major causes of death following subarachnoid hemorrhage [J]. Stroke. 1994, 25(7): 1342-1347
- [6] Pfohman M, Criddle LM. Epidemiology of intracranial aneurysm and subarachnoid hemorrhage[J]. J Neurosci Nurs, 2001, 33(1): 39-41
- [7] Pluta RM, Hansen-Schwartz J, Dreier J, et al. Cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage: time for a new world of thought [J]. Neurol Res. 2009, 31(2): 151-158
- [8] Kusaka G, Ishikawa M, Nanda A, et al. Signaling pathways for early brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2004, 24(8): 916-925
- [9] Offerhaus L, van Gool J. Electrocardiographic changes and tissue catecholamines in experimental subarachnoid hemorrhage [J]. Cardiovasc Res, 1969, 3(4): 433-440
- [10] Chan RC, Durity FA, Thompson GB, et al. The role of the prostacyclin/thromboxane system in cerebral vasospasm following induced subarachnoid hemorrhage in the rabbit [J]. J Neurosurg, 1984, 61(6): 1120-1128
- [11] Otsuji T, Endo S, Hirashima Y, et al. An experimental model of symptomatic vasospasm induced by oxyhemoglobin in rabbits [J]. Stroke, 1994, 25(3): 657-662
- [12] Bederson JB, Germano IM, Guarino L. Cortical blood flow and cerebral perfusion pressure in a new noncraniotomy model of subarachnoid hemorrhage in the rat[J]. Stroke, 1995, 26(6): 1086-1092
- [13] Veelken JA, Laing RJ, Jakubowski J. The Sheffield model of subarachnoid hemorrhage in rats[J]. Stroke, 1995, 26(7): 1279-1284